

Title	Altered Transport Velocity of Axonal Mitochondria in Retinal Ganglion Cells After Laser-Induced Axonal Injury In Vitro(Abstract_要旨)
Author(s)	Yokota, Satoshi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k20244
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	横 田 聡
論文題目	Altered Transport Velocity of Axonal Mitochondria in Retinal Ganglion Cells After Laser-Induced Axonal Injury In Vitro （レーザーによる軸索障害後の網膜神経節細胞のミトコンドリアの軸索内輸送速度の変化）		
（論文内容の要旨）			
<p>動物実験において眼圧上昇により軸索内輸送が阻害されることや培養細胞では脳由来神経栄養因子の軸索内輸送の障害によりアポトーシスを起こすことが報告されている。緑内障性視神経症モデルマウスでは網膜神経節細胞のミトコンドリアの軸索輸送障害が示されている。神経細胞は軸索を長く伸ばしたその形態的特徴からも、細胞内のエネルギー供給源であるミトコンドリアが適正に分布する必要がある。軸索内輸送が障害されると局所でのエネルギー需要量を満たすことができない。軸索輸送障害が緑内障性視神経症に関与していると考えられている。</p> <p>これまでのモデルでは細胞体への障害か、樹状突起への障害か、軸索への障害かいずれによる軸索内輸送の変化や細胞死か区別がつかない。そのため、本研究ではラット網膜から単離した網膜神経節細胞の培養系を用いて、レーザーにより単一の軸索のみを障害することで、軸索損傷後のミトコンドリア軸索内輸送と網膜神経節細胞の生死についての関連の検討を行った。</p> <p>生後 3 日齢のラットより two-step immunopanning 法により網膜神経節細胞を単離した。単離後 6 日間の培養ののち、ローダミン 123 を用いてミトコンドリアを標識し、3 秒ごとのタイムラプス画像を 3 分間撮影した。マイクロダイセクションに用いられるレーザーにより軸索を切断し、その 5 分後、18 時間後に同様にタイムラプス画像を撮影した。タイムラプス画像よりキモグラフを作成し軸索輸送の量的解析を行った。レーザーによる軸索切断から 3 日後にアポトーシスの有無を確認した。</p>			

<p>観察した 17 個の網膜神経節細胞において、軸索内を輸送されているミトコンドリアはレーザー障害前(n = 834)は、順行輸送 23.4%、逆行輸送 21.0%、停止 37.6%、fluttering 18.0%であった。レーザー障害 5 分後(n = 642)は、それぞれ 12.3%、7.6%、70.6%、9.5%と停止しているものが増加していた($P < 0.001$)。18 時間後(n = 544)は、それぞれ 11.0%、15.6%、63.7%、9.7%と、障害前と比較して停止しているものの割合が増えていた($P < 0.001$)が、レーザー障害 5 分後と比較すると停止している割合は減っていた($P = 0.010$)。</p> <p>ミトコンドリアの軸索内の輸送速度はレーザー障害前が 0.48 ± 0.01 (平均 \pm 標準誤差) $\mu\text{m}/\text{秒}$であったが、レーザー障害 5 分後が $0.37 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{秒}$と低下していた($P < 0.001$)。18 時間後には $0.46 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{秒}$と 5 分後の比較して改善していた($P = 0.002$)。5 分後から 18 時間後で輸送速度が改善した細胞(n = 4)は、3 日後に細胞死のマーカーであるエチジウムホモダイマー1(Eth-D1)陽性細胞を認めなかったのに対して、輸送速度が改善しなかった細胞(n = 13)は 69.2%に EthD-1 陽性細胞を認めた($P = 0.029$)。</p> <p>網膜神経節細胞の軸索障害後、ミトコンドリアの軸索内輸送の停止が増加し、かつ輸送速度が低下した。その後、軸索内輸送速度が改善したものとそうでないものでは細胞死へ至る率に差があった。ミトコンドリア軸索輸送評価は細胞死を予測するのに有用である可能性がある。</p>

（論文審査の結果の要旨）

緑内障は国内の視覚障害の最も多い原因である視神経疾患である。視神経は、網膜神経節細胞の軸索から構成され、その軸索は篩状板より前方は無髄の線維である。無髄の線維は神経伝達に多量のエネルギーを要する。そのため、エネルギーを供給するミトコンドリアが重要になる。

本研究ではラット網膜から単離した網膜神経節細胞の初代培養系を用いて、レーザーにより軸索のみを物理的に傷害し、軸索損傷後のミトコンドリアの軸索内輸送の変化と細胞死との関連を検討した。

軸索を物理的に切断すると、直後から切断部より近位のミトコンドリア軸索輸送の速度が減少した。その後、18 時間でミトコンドリアの軸索内輸送の速度が改善した細胞は生存したが、改善しなかった細胞の多くは細胞死を起こした。

軸索のみを選択的に傷害したモデルにおいて、ミトコンドリアの軸索内輸送の経時変化を観察し得た。ミトコンドリアの軸索内輸送の変化を観察することで、細胞死を起こす前に網膜神経節細胞の生死を予想することができる可能性が示唆された。

以上の研究はミトコンドリアの軸索内輸送と細胞死との関連の解明に貢献し緑内障の病態解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降